

## ГІНЕКОЛОГІЯ

УДК 618.177:618.12-007.272-06:618.14-002:618.111-008.8]-091.818

*В.В. Орлова<sup>1</sup>, Л.В. Суслікова<sup>1</sup>, О.А. Орлова<sup>2</sup>, Д.В. Дмитрієнко<sup>3</sup>**<sup>1</sup>Український державний інститут репродуктології**Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика, м. Київ**<sup>2</sup>ДЗ «Луганський державний медичний університет»**<sup>3</sup>Луганський національний університет ім. В. Даля***РІВЕНЬ ФРАГМЕНТОВАНОЇ ДНК ЕНДОМЕТРІЮ  
ТА ФОЛІКУЛЯРНОЇ РІДИНИ  
ПРИ ТРУБНО-ПЕРИТОНЕАЛЬНОМУ БЕЗПЛІДДІ**

Вивчали порушення апоптозу в репродуктивному тракті жінок з трубно-перитонеальним безпліддям. Результати дослідження показали порушення процесу апоптозу в ендометрії та фолікулярній рідині, а також зв'язок апоптозу з окислювальним стресом. Рівень фрагментації ДНК можна розглядати як додатковий прогностичний маркер настання вагітності, що дозволить покращити ефективність лікування безпліддя.

**Ключові слова:** апоптоз, ДНК-фрагментація, окислювальний стрес, трубно-перитонеальне безпліддя, ендометрій, фолікулярна рідина.

**Вступ**

Питання фертильної нереалізованості є досить актуальним сьогодні, тому що кожна п'ята пара в нашій країні є безплідною. Трубно-перитонеальний фактор безпліддя – одна з причин звернення сімейних пар до проведення допоміжних репродуктивних технологій як ефективного способу лікування. Для підвищення ефективності лікування безпліддя необхідно вивчити фактори, які впливають на регуляцію імплантації – одного із складних етапів процедури допоміжних репродуктивних технологій.

Структурна і функціональна перебудова ендометрію протягом менструального циклу пов'язана зі змінами апоптозу ендометріальних клітин [1, 2]. Як правило, апоптоз – це результат опосередкованої (через рецепторні системи клітини) неспецифічної або нефізіологічної дії зовнішніх чинників, які виступають як індуктори, здатні при інтенсивній дії викликати загибель клітин. Порушення апоптозу асоційовано з поганою якістю ооцитів, «порожніми» фолікулами, низьким рівнем запліднення та імплантації, поганим розвитком ембріонів [3–5].

Одна із фінальних стадій апоптозу реалізується в ядрі клітини і полягає у фрагментації ДНК. У відповідь на пошкодження ДНК запускаються захисні реакції, спрямовані на її відновлення. Невдалі спроби відновити ДНК призводять до повного енергетичного виснаження клітини, що і стає прямою причиною її загибелі [6], отже, фрагментація ядерної ДНК є одним із основних біохімічних маркерів апоптозу.

Таким чином, при порушенні регуляції апоптозу знижується фертильність жінок, тому вивчення маркерів апоптозу в цій категорії безплідних пацієнток може бути корисним у пошуку нових прогностичних факторів ефективності їх лікування методами допоміжних репродуктивних технологій.

**Мета** дослідження – визначити рівень фрагментації ДНК в ендометрії та фолікулярній рідині жінок з трубно-перитонеальним фактором безпліддя та простежити зв'язок апоптозу з розвитком окислювального стресу в тканинах.

**Матеріал і методи**

У дослідженні прийняли участь 65 жінок 1-ї (основної) групи з безпліддям трубно-

перитонеального генезу, що проходили лікування в клініці репродуктивних технологій Українського державного інституту репродуктології в м. Києві. Для комплексної оцінки стану репродуктивної системи всі пацієнтки були обстежені згідно Наказу МОЗ України № 787 від 09.09.13 про затвердження порядку застосування допоміжних репродуктивних технологій в Україні. В 2-гу (контрольну) групу увійшло 35 відносно здорових жінок з нормальним перебігом вагітності та фізіологічними пологами. Середній вік досліджуваних жінок обох груп складав  $(33,00 \pm 1,41)$  року.

Обстеження пацієнток проводили за допомогою рутинних методів: збір анамнезу, скарги, гінекологічний огляд, клініко-лабораторне дослідження за стандартними методиками. Забір ендометрію проводили всім жінкам у другій фазі циклу на 19-й–22-й день за допомогою пайпель-біопсії. Фолікулярну рідину для дослідження отримували шляхом трансвагінальної пункції фолікулів після вилучення яйцеклітин у жінок з безпліддям, що проходили лікування методами допоміжних репродуктивних технологій.

Отримані дані статистично обробили за допомогою Microsoft Office Excel 2003 і програми для рангової кореляції методом Спірмена. Відмінності даних оцінювали за Уїлкоксоном. Рівень значущості вважали достовірним при  $p=0,05$ .

#### Результати та їх обговорення

Пацієнтки основної групи мали безпліддя трубно-перитонеального генезу, яке тривало в середньому  $(6,75 \pm 1,43)$  року. У 72,4% жінок було вторинне безпліддя, у 27,6% – первинне. В структурі безпліддя у 72,3% пацієнток були відсутні маткові труби, у 18,4% – були непрохідні. Середня кількість вагітностей і своєчасних пологів у жінок з вторинним безпліддям

була статистично нижчою, а частота позаматкових вагітностей більшою в порівнянні з фертильними жінками ( $p<0,05$ ).

В анамнезі пацієнток з трубно-перитонеальним безпліддям на відміну від фертильних пацієнток спостерігалася більш висока частота запальних захворювань органів малого таза (100 проти 40%,  $p<0,05$ ), злукової хвороби органів малого таза (95,3 проти 22,8%,  $p<0,05$ ), інфекцій, що передаються статевим шляхом (68,7 проти 28,5%,  $p<0,05$ ).

Дослідження фрагментованої ДНК в ендометрії жінок основної групи показало її підвищений в 1,5 рази порівняно з контрольною групою рівень: 6,9 і 4,6% відповідно,  $p>0,05$ , що свідчить про активацію апоптозу при безплідді.

Останнім часом глибоко вивчається роль вільних радикалів у запуску апоптозу. Було виявлено, що апоптозу піддаються клітини з високим рівнем активних форм кисню [7]. Встановлено, що до внутрішньоклітинних стимулів апоптозу відноситься надлишок  $H^+$ , підвищена температура, внутрішньоклітинні віруси і гормони, які реалізують свій ефект через ядерні рецептори, а також вільні радикали ліпідів та інші прооксиданти [8].

Власні дослідження показали, що трубно-перитонеальне безпліддя супроводжується розвитком окислювального стресу в тканинах репродуктивного тракту [9]. На підставі цих даних нами проведено кореляційний аналіз взаємозв'язків між фрагментацією ДНК і вмістом прооксидантів. Виявлено статистично значущу позитивну кореляцію між рівнем продуктів пероксидації ліпідів і вмістом фрагментованої ДНК, що вказує на опосередковане порушення регуляції апоптозу під впливом окислювального стресу при безплідді (табл. 1). Для підтвердження цього факту було оцінено

Таблиця 1. Матриця кореляційних зв'язків активності супероксиддисмутази, каталази та інтенсивності окислювальної модифікації білка, накопичення ТБК-продуктів та фрагментації ДНК в ендометрії жінок з безпліддям

Пари кореляційних зв'язків	Коефіцієнт кореляції, r
ТБК-продукти – ДНК-фрагментація	0,440
АФГ – ДНК-фрагментація	0,023
КФГ – ДНК-фрагментація	0,002
АФГ – ДНК-фрагментація	0,067
КФГ – ДНК-фрагментація	0,004
СОД – ДНК-фрагментація	-0,400
Каталаза – ДНК-фрагментація	-0,059

Примітка. При заданому рівні значущості  $p=0,05$ ,  $n=65$ , критичне значення  $r_{кр}=0,244$ .

також взаємозв'язок між активністю антиоксидантів – ензимів (СОД, каталаза) та активацією апоптозу. Встановлено значну негативну кореляцію апоптозу з активністю СОД.

Отже, фактор безпліддя, який супроводжується розвитком окислювального стресу в ендометрії, впливає на порушення регуляції апоптозу. В літературі наведено дані про зниження експресії факторів регуляції апоптозу в ендометрії жінок з трубно-перитонеальним безпліддям. Але автори стверджують, що настання вагітності пов'язане зі збільшенням проапоптотичних факторів у репродуктивному тракті пацієнток [10].

Таблиця 2. Матриця кореляційних зв'язків активності супероксиддисмутази, каталази та інтенсивності окислювальної модифікації білка, накопичення ТБК-продуктів та фрагментації ДНК в фолікулярній рідині жінок з безпліддям

Пари кореляційних зв'язків	Коефіцієнт кореляції, r
ТБК-продукти – ДНК-фрагментація	0,74
АФГ – ДНК-фрагментація	0,76
КФГ – ДНК-фрагментація	0,57
АФГ – ДНК-фрагментація	0,68
КФГ – ДНК-фрагментація	0,64
СОД – ДНК-фрагментація	0,34
Каталаза – ДНК-фрагментація	0,57

Примітка. При заданому рівні значущості  $p=0,05$ ,  $n=33$ , критичне значення  $r_{кр}=0,35$ .

Рівень фрагментації ДНК у фолікулярній рідині оцінювали серед 65 безплідних жінок, які проходили лікування методами допоміжних репродуктивних технологій, 33 з них отримували антиоксидантну терапію та склали групу контролю. Дослідження фрагментації ДНК у фолікулярній рідині показало в 1,3 раза вищий рівень фрагментованої ДНК у жінок з безпліддям трубно-перитонеального генезу, які не отримували антиоксидантну терапію: 3,9 і 5,2% відповідно,  $p<0,05$ . Різниця була статистичною, що свідчить про порушення апоптотичного процесу в цій групі і в ендометрії, і в

фолікулярній рідині. За даними авторів [3, 5], високий рівень апоптозу асоційовано з низьким рівнем успішності екстракорпорального запліднення.

Проведений кореляційний аналіз показав потужний позитивний зв'язок між вмістом прооксидантів і рівнем фрагментації ДНК у фолікулярній рідині як для ТБК-продуктів, так і для показників окислювальної модифікації білка. На відміну від ендометрію, у фолікулярній рідині нами виявлено сильну негативну кореляцію між активністю каталази та деградацією ДНК (табл. 2), що не характерно для активності СОД.

Таким чином, порушення регуляції апоптозу у пацієнток з трубно-перитонеальним безпліддям у фолікулярній рідині, яка є мікрооточенням яйцеклітини, та в ендометрії, який є субстратом для імплантації, супроводжується підвищенням фрагментації ДНК на тлі розвитку окислювального стресу. Отримані дані можуть бути корисними для оцінки якості ооцитів, ембріонів, імплантаційної здатності ендометрію; рівень фрагментації ДНК можна розглядати як додатковий прогностичний маркер настання вагітності, що дозволить покращити ефективність лікування безпліддя.

## Література

1. Яманова М.В. Эндокринное бесплодие: клеточная и молекулярная патология имплантации / М.В. Яманова, А.Б. Салмина. – Москва: Медика, 2009. – 200 с.
2. Regulation of apoptosis in endometrium preparation for menstruation or embryo implantation / M. Szmidt, P. Sysa, T. Niemiec et al. // Ginekol. Pol. – 2010. – Vol. 81 (11). – P. 856–859.
3. Liu J. Effect of oxidative stress and apoptosis in granulosa cells on the outcome of IVF-ET / J. Liu, Y. Li // Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. – 2010, Sep. – Vol. 35 (9). – P. 990–994.
4. Feldmann G. Apoptosis of granulosa cells as a predictive marker of in vitro fertilization success? / G. Feldmann, J.L. Benifla, P. Madelenat // Gynecol. Obstet. Fertil. – 2006. – Vol. 34 (7–8). – P. 547–582.
5. Oxidative status in granulosa cells of infertile women undergoing IVF / N.B. Karuputhula, R. Chattopadhyay, B. Chakravarty, K. Chaudhury // Systems Biology in Reproductive Medicine. – 2013. – Vol. 59 (2). – P. 91–98.

6. Губский Ю.И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз: монография / Ю.И. Губский. – Винница: Нова Книга, 2015. – 360 с.
7. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis / K. Sinha, J. Das, P.B. Pal, P.C. Sil // *Archives of Toxicology*. – 2013. – Vol. 87 (7). – P. 1157–1180.
8. Agarwal A. Role of oxidative stress in female reproduction / A. Agarwal, S. Gupta, R.K. Sharma // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2005. – Vol. 3. – P. 28.
9. Орлова В.В. Вивчення стану про/антиоксидантної системи в репродуктивному тракті жінок з трубно-перитонеальним безпліддям / В.В. Орлова // *Медицина сьогодні і завтра*. – 2018. – № 1. – С. 72.
10. Changes of apoptosis regulation in the endometrium of infertile women with tubal factor and endometriosis undergoing in vitro fertilization treatment / Yu. Antsiferova, N. Sotnikova, I. Bogatova, A. Boitsova // *JBRA Assisted Reproduction*. – 2014. – Vol. 18 (1). – P. 2–6.

## References

1. Yamanova M.V., Salmina A.B. (2009). *Endokrinnoie besplodiie: kletochnaia i molekuliarnaia patolohiia implantatsii* [Endocrine infertility: cellular and molecular pathology of implantation]. Moscow: Medika, 200 s. [in Russian].
2. Szmidi M., Sysa P., Niemiec T., Urbanska K., Bartyzel B. (2010). Regulation of apoptosis in endometrium preparation for menstruation or embryo implantation. *Ginekol. Pol.*, vol. 81 (11), pp. 856–859.
3. Liu J., Li Y. (2010, Sept.). Effect of oxidative stress and apoptosis in granulosa cells on the outcome of IVF-ET. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, vol. 35 (9), pp. 990–994.
4. Feldmann G., Benifla J.L., Madelenat P. (2006). Apoptosis of granulosa cells as a predictive marker of in vitro fertilization success? *Gynecol. Obstet. Fertil.*, vol. 34 (7–8), pp. 547–582.
5. Karuputhula N.B., Chattopadhyay R., Chakravarty B., Chaudhury K. (2013). Oxidative status in granulosa cells of infertile women undergoing IVF. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, vol. 59 (2), pp. 91–98.
6. Gubskiy Yu.I. (2015). *Smert kletki: svobodnyie radikalny, nekroz, apoptoz: monografiia* [Cell death: free radicals, necrosis, apoptosis: monograph]. Vinnitsa: Nova Kniha, 360 p. [in Russian].
7. Sinha K., Das J., Pal P.B., Sil P.C. (2013). Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology*, vol. 87 (7), pp. 1157–1180.
8. Agarwal A., Gupta S., Sharma R.K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 3, p. 28.
9. Orlova V.V. (2018). Vychennia stanu pro/antyoksydantnoii systemy v reproduktyvnomu trakti zhinok z trubno-peritonealnym bezpliddiam [Study of the state of the anti-oxidant system in the reproductive tract of women with tubal-peritoneal infertility]. *Medytsyna sohodni i zavtra – Medicine today and tomorrow*, № 1, p. 72 [in Ukrainian].
10. Antsiferova Yu., Sotnikova N., Bogatova I., Boitsova A. (2014). Changes of apoptosis regulation in the endometrium of infertile women with tubal factor and endometriosis undergoing in vitro fertilization treatment. *JBRA Assisted Reproduction*, vol. 18 (1), pp. 2–6.

**В.В. Орлова, Л.В. Сусликова, Е.А. Орлова, Д.В. Дмитриенко**

### УРОВЕНЬ ФРАГМЕНТИРОВАННОЙ ДНК ЭНДОМЕТРИЯ И Фолликулярной жидкости ПРИ ТРУБНО-ПЕРИТОНЕАЛЬНОМ БЕСПЛОДИИ

Изучали апоптоз в репродуктивном тракте женщин с трубно-перитонеальным бесплодием. Результаты исследования показали нарушение процесса апоптоза в эндометрии и фолликулярной жидкости, а также связь апоптоза с окислительным стрессом. Уровень фрагментации ДНК можно рассматривать как дополнительный прогностический маркер наступления беременности, который позволит улучшить эффективность лечения бесплодия.

**Ключевые слова:** апоптоз, ДНК-фрагментация, окислительный стресс, трубно-перитонеальное бесплодие, эндометрий, фолликулярная жидкость.

**V.V. Orlova, L.V. Suslikova, O.A. Orlova, D.V. Dmitrienko**

### LEVEL OF DNA FRAGMENTATION OF THE ENDOMETRIUM AND FOLLICULAR FLUID IN TUBOPERITONEAL INFERTILITY

The study is devoted to investigation of apoptosis in the reproductive tract of women with tuboperitoneal infertility. The results of the study showed impaired apoptosis in the endometrium and follicular fluid, and

connection with oxidative stress. The level of DNA fragmentation can be considered as an additional prognostic marker of pregnancy, which will improve the effectiveness of infertility treatment.

**Key words:** *apoptosis, DNA fragmentation, oxidative stress, tuboperitoneal infertility, endometrium, follicular fluid.*

*Надійшла до редакції 29.10.18*

### **Контактна інформація**

*Орлова Вікторія Вікторівна* – аспірант кафедри акушерства, гінекології та репродуктології Українського державного інституту репродуктології Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика.

Адреса: Україна, 04112, м. Київ, вул. Дорогожицька, 9.

Тел.: +380950590993.

E-mail: dr.vikoriiaorlova@gmail.com.

ORCID: 0000-0003-2821-4767.

*Суслікова Лідія Вікторівна* – доктор медичних наук, професор кафедри акушерства, гінекології та репродуктології Українського державного інституту репродуктології Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика.

ORCID: 0000-0003-2821-4767.

*Орлова Олена Анатоліївна* – доктор біологічних наук, професор кафедри фармацевтичної хімії та фармакогнозії ДЗ «Луганський державний медичний університет».

ORCID: 0000-0002-3039-6494.

*Дмитрієнко Дмитро Володимирович* – кандидат технічних наук, доцент кафедри фармацевтичної хімії та фармакогнозії Луганського національного університету ім. В. Даля.

ORCID: 0000-0002-8030-4711.